



TITLE:

The E3 ligase RFWD3 promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Inano, Shojiro

CITATION:

Inano, Shojiro. The E3 ligase RFWD3 promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-09-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20668>

RIGHT:

Copyright © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

京都大学	博士（医学）	氏 名	稲野 将二郎
論文題目	The E3 ligase RFWD3 promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination (E3 ユビキチン化酵素 RFWD3 は RPA と RAD51 を適時除去することで相同組換えを促進する)		
(論文内容の要旨)			
<p>RFWD3 は、RING 型 E3 酵素であり、Fanconi 貧血患者の全エクソン解析から原因遺伝子として同定された背景を持つ。本研究は、RFWD3 の分子機能を明らかにしたものである。</p> <p>Fanconi 貧血は DNA 鎖間架橋(ICL)の修復障害を特徴とするため、まず RFWD3 欠損細胞が ICL 誘導剤である MMC に強い感受性を持つことを確認した。重要なことに、WT の RFWD3 を RFWD3 欠損細胞に導入した場合には MMC への感受性は軽減されたが、E3 活性をもたない C315A 変異体では影響がなく、ICL 修復には E3 活性が必須であることが示された。</p> <p>ICL 修復経路は DNA 二重鎖切断の導入、相同組み換え(HR)というプロセスで進行するが、 RFWD3 欠損細胞では MMC によりクロマチン上にリクルートされる RPA 及び RAD51 の量は増加を示し、DNA 二重鎖切断及び末端のプロセッシングには問題ないことが示唆される。従って、RFWD3 は ICL 修復の後期、HR において重要な機能を果たすと推察された。</p> <p>RFWD3 は E3 ligase であることから、その分子機能を解明するにあたって最も重要となるのが基質である。そこで RFWD3 欠損細胞においては、MMC 刺激下でクロマチン上に残存する RPA 及び RAD51 が増加することに注目し、両者が主要な基質である仮説を立てた。そして in vitro 及び in vivo の両面で検証において、RFWD3 が両者をユビキチン化し得ることを確認した。</p> <p>次に、RPA と RAD51 のユビキチン化が HR に必要かを検証するため、ユビキチン化を受けない RPA2 及び RAD51 の変異体(5KR 変異体)をそれぞれ作成した。レンチウイルスで U2OS DR-GFP 細胞に siRNA 耐性 RPA2 及び RAD51 を発現させ、内在性の RPA2 及び RAD51 を siRNA でノックダウンして入れ替えたところ、5KR 変異体を発現した細胞では、RPA2, RAD51 いずれにおいても WT に比べて低い HR 効率を示した。またその際 5KR 変異体はクロマチン分画に WT に比して長く留まっており、また FRAP(fluorescence recovery after photobleaching)解析による蛋白の turnover を見ても WT に比して低い値を示した。上記より、RFWD3 によるユビキチン化は基質をクロマチンから解離させることで HR に寄与しているものと考えられた。</p> <p>次にユビキチン化された RPA 及び RAD51 がクロマチンから除去されるメカニズムを検証し、1)ユビキチン化された RPA 及び RAD51 は単鎖 DNA への結合能が低下すること、2)クロマチンからの解離は ATP 依存シャペロン蛋白である VCP に介在されること、を発見した。</p> <p>ただし、RPA 及び RAD51 は HR において重要な制御因子であることから、RFWD3 の活性は厳密に制御されている必要がある。その機序として少なくとも ATR/ATM kinase による RFWD3 のリン酸化が必要であることを見出した。</p> <p>RPA と RAD51 が残存することがなぜ HR を阻害するかを考えた場合、HR 後期に</p>			

<p>働く修復因子のクロマチンへのアクセスを阻害することが一因として推定された。そこで MCM8 及び RAD54 に注目したところ、MMC 刺激下において両者がクロマチンにリクルートされるために RFWD3 が必要であることが分かった。</p> <p>結論として、RFWD3 は RPA と RAD51 をユビキチン化して除去することで、HR の進行に必要な諸因子のクロマチンへのアクセスを可能にしていると考えられた。</p> <p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>DNA 鎖間架橋（interstrand crosslinks；ICL）は複製、転写を阻害する極めて有害な DNA 損傷である。ICL の修復は多くの蛋白によって協調的に行われているが、このいずれかが欠落してもファンconi貧血(Fanconi anemia；FA)を発症する。FA 患児の遺伝学解析により現在までに 21 の因子が同定されており、ICL 修復経路の解明に大きく寄与してきた。</p> <p>本研究ではドイツで診断された患児細胞の全エクソン解析から、E3 ligase である RFWD3 に複合ヘテロ変異が存在することを同定し、ノックアウト細胞での実験から RFWD3 が新たなファンconi貧血の原因遺伝子であることを証明した。</p> <p>ICL は単純化すると DNA 二重鎖切断の導入と、引き続く相同組換え（homologous recombination；HR）であるが、RFWD3 は HR を促進することが報告されていたものの、詳細な分子機能は未解明であった。本研究では、RFWD3 は重要な HR 制御因子である RPA と RAD51 双方をユビキチン化することを明らかにした。ユビキチン化された RPA と RAD51 は構造的に DNA との結合力が低下し、ATP 依存性シャペロン蛋白である VCP に介在されることでプロテアソームに運搬され分解を受ける。この機能は、クロマチン上の蛋白を入れ替えて HR を次のプロセスに進行させるために必要と考えられた。</p> <p>以上の研究は DNA 修復の解明に貢献し癌治療や発癌のメカニズム解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 8 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			